Der Einfluß von Pharmaka auf den Glukosetransport in der menschlichen Erythrozytenmembran

Maximilian Ohneis

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0067

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Der Einfluß von Pharmaka auf den Glukosetransport in der menschlichen Erythrozytenmembran

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Ohneis

Neufahrn i. NB

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Remien
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

An dieser Stelle sei es mir erlaubt, Herrn Priv.-Doz. Dr. Joerg Remien für die Anregung und die großzügige Förderung der Arbeit zu danken.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinem Vater (+ 30. Nov. 1977)

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG ..... S. 7

II. METHODIK

1. Herstellung der Inkubationslösung ..... S. 11
2. Herstellung der Erythrozytensuspension .... S. 12
3. Inkubation der Erythrozyten in der Arzneimittellösung ..... S. 12
4. Das Auswaschmedium ..... S. 13
5. Versuchsablauf ..... S. 13
6. Glukosebestimmung ..... S. 15
7. Bestimmung des intrazellulären Lösungsraumes für Glukose ..... S. 16
8. Pharmaka ..... S. 16
9. Berechnung der Eliminationshalbwertszeit für Glukose ..... S. 17
10. Berechnung der Transportkonstanten K_m und V_{max} ..... S. 18

III. ERGEBNISSE ..... S. 21

IV. DISKUSSION ..... S. 28

Kritik der Methode

1. Der Einfluß des mangelhaften Stoppeffektes von $HgCl_2$ und Glutardialdehyd auf die Messung der spezifischen Carrierfunktion ..... S. 29
2. Veränderungen des Volumens der Erythrozyten durch kurzfristige Beladung mit hohen Glukosekonzentrationen ..... S. 30

3. Störung der enzymatischen Glukosebestimmung durch Bildung eines Farbstoffes bei der Autoxidation von 4-Dimethylaminophenol .... S. 33

Besprechung der Ergebnisse

1. Glukosetransport über die menschliche Erythrozytenmembran
1.1. Kinetische Parameter des Glukosefluxes .. S. 34
1.2. Forschungsmethoden ..... S. 35

2. Der Einfluß von Pharmaka
2.1. Rückschlüsse aus der Wirkungsweise und der Konfiguration von Pharmaka auf den Carrier ..... S. 39
2.2. Die Wirkung von 4-Dimethylaminophenol auf die Membran der Erythrozyten ..... S. 40

V. ZUSAMMENFASSUNG ..... S. 44

VI. LITERATURVERZEICHNIS ..... S. 46

I. EINLEITUNG

Schon bei einzelligen Lebewesen gibt es Membransysteme unterschiedlicher Komplexität. Überzellige Systeme verfügen fast ausnahmslos über Membranen "höherer Ordnung", die zur stofflichen Abgrenzung bestimmter Körperräume dienen und eine Regulation des Austausches zwischen diesen übergeordneten Kompartimenten erlauben. In dieser Hierarchie gibt es eine "kleinste Einheit", die ihrerseits nicht noch weiter in membranöse Elemente zerlegbar ist. Diese Einheit ist die Elementarmembran (Sitte 1969). Das der Wirklichkeit wohl sehr nahe stehende Modell der Elementarmembran entwickelten Danielli und Davson (1935) und Robertson (1959).
Die Zellmembran wird in diesem Modell auf der Innen- und Außenseite durch eine Proteinschicht begrenzt, wobei diese auf der Innenseite eine andere Struktur besitzt, als auf der Außenseite. Dazwischen befindet sich eine bimolekulare Schicht polar angeordneter Phospholipidmoleküle. Die polaren, nach außen gerichteten Gruppen der Lipide bilden elektrostatische Bindungen mit den Proteinen, während die apolaren Gruppen der Lipide ins Innere der Membran reichen.
Da dieses Modell der "unit membrane" bestimmte Eigenschaften der Zellmembran nicht erklärt, wurden weitere Modelle entwickelt. Singer und Nicolson (1972) eröffneten mit ihrem "fluid mosaic model" neue Gedankengänge über Membranfunktionen und -phänomene. Bei diesem Modell sind in eine Doppelschicht von Phospholipiden (analog der "unit membrane") Proteinkörper eingebettet, deren polare Gruppen auf einer oder auf beiden Seiten der Membran herausragen, während die nichtpolaren Gruppen tief in der hydrophoben Innenschicht versenkt sind. Diese Eiweißkör-

per erfüllen die Voraussetzungen sowohl für Transportvorgänge, als auch für viele Phänomene auf dem Gebiet der Immunologie (Antigeneigenschaften, Hapten, Pinocytose u.a.).

Folgende Transportprozesse kommen an Elementarmembranen vor:

1. Passive Permeation
2. Katalysierte Permeation (facilitated diffusion)
3. Aktiver Transport

Um ein spezifisches Milieu zu schaffen, das für den Stoffwechselvorgang notwendig ist, muß eine Schranke für eine freie Diffusion vorliegen. Diese Schranke stellt die grundlegende Funktion der biologischen Membran dar. Um der Regelmäßigkeit und Schnelligkeit der umfassenden Zellaktivitäten zu genügen, sollten die Umsätze mit angemessener Spezifität und Geschwindigkeit erfolgen (Jung 1975).
Der Transport von D-Glukose und verwandter Hexosen über die menschliche Erythrozytenmembran wird als katalysierte Permeation charakterisiert (Bowyer und Widdas 1958; Dawson und Widdas 1963).
Die erste Grundeigenschaft des Glukosetransportsystems ist seine bemerkenswerte Geschwindigkeit bei der Übertragung hydrophiler Moleküle, insbesondere D-Glukose, über die hydrophobe Membranschranke. Die zweite Grundeigenschaft ist sein stereospezifisches Erkennungsvermögen von eng verwandten Molekülen (Isomere) z. B. D-Glukose und L-Glukose. Die treibende Kraft dieser katalysierten Permeation ist, wie auch bei der passiven Diffusion, der osmotische Aktivitätsgradient des Zuckers. Wegen dieser Tat-

sache wurde der Glukoseflux in den Erythrozyten von Danielli (1954) und Stein (1967) als "carrier mediated diffusion" beschrieben.

Beim Studium dieses Carrier-vermittelten Glukosetransports über die menschliche Erythrozytenmembran wurden insgesamt sechs verschiedene Verfahren entwickelt (Jung 1975).
Das erste Verfahren, das equilibrium-exchange-Verfahren nach Lieb und Stein (1971 a) stellt die einfachste Form der Fluxmessung dar. Die Zellen werden mit Zucker auf eine gegebene Konzentration ausbalanziert und der unidirektionale Flux wird durch Zugabe seines Isotopenindikators gemessen. Dabei werden Austauschgeschwindigkeiten zwischen gleichen Zuckerarten bei Fortfall des Nettoumsatzes gemessen.
Das zweite Verfahren nach Miller (1968) ist dem ersten ähnlich. Es mißt Austauschgeschwindigkeiten zwischen verschiedenen Zuckerpaaren, die in gleichen Konzentrationen, aber auf gegenüberliegenden Seiten der Membran vorhanden sind.
Das dritte, das zero-trans-Verfahren nach Lieb und Stein (1971 a) mißt den unidirektionalen Zuckerumsatz bei Fortfall jeden Austauschfluxes. Die Zellen werden mit Zucker auf eine gegebene Konzentration aufgeladen und in ein großes Volumen eines zuckerfreien Mediums pipettiert. Die Verlustgeschwindigkeit des Zuckers aus den Zellen kann nach schnellem Abzentrifugieren zu jedem beliebigen Zeitpunkt in den Erythrozyten bestimmt werden.
Das vierte Verfahren ist das infinite-cis-Verfahren nach Sen und Widdas (1962). Hierbei ist der Zucker auf beiden Seiten anwesend, aber die Zuckerkonzentration innerhalb der Zellen wird auf einem Niveau fixiert, das hoch genug

ist, um die Carrierfunktion zu sättigen, während die Aussenkonzentration verändert wird.
Das fünfte Verfahren ist das sogenannte counter-transport-Verfahren von Rosenberg und Wilbrandt (1957 b). Dieses mißt einen Zuckerflux in Anwesenheit einer zweiten Zuckerart, unter der Bedingung, daß der zweite Zucker bereits im vollkommenen Konzentrationsgleichgewicht an beiden Seiten der Membran vorliegt.
Das sechste Verfahren ist das competition-Verfahren nach Widdas (1954), das benutzt wurde, um die Affinitätskonstante eines Zuckers für den Carrier zu bestimmen, indem sein Hemmeffekt auf den Flux eines bestimmten Zuckers gemessen wird.
In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir an menschlichen Erythrozyten den Einfluß von einigen Pharmaka auf den Glukosetransport mit dem zero-trans-Verfahren nach Lieb und Stein (1971 a), das wir in einigen Punkten abgeändert haben.
So erreichten wir durch eine Temperatursenkung auf 2° C eine Verlangsamung des Glukoseeffluxes. Dies hatte zur Folge, daß wir mit im physiologischen Bereich liegenden Glukosekonzentrationen arbeiten konnten und zudem auf die Anwendung von radioaktiven Isotopen verzichten konnten.
Mehrere Arbeiten postulieren, daß der Glukosetransport über die Erythrozytenmembran eine intakte Sulfhydryl-Gruppe an der Außenseite der Membran erfordert (LeFevre 1961; Dawson und Widdas 1963; Jung 1975). Batt et al.(1976) vermuten, daß auch eine SH-Gruppe in der Membran oder an deren Innenfläche für den Carrier-vermittelten Glukosetransport notwendig ist. Wir untersuchten unter anderem mit 4-Dimethylaminophenol, diese hypothetischen SH-Gruppen an der Innenseite der Membran zu binden und damit den Glukoseefflux zu hemmen.

II. METHODIK

1. Herstellung der Inkubationslösung

Als Inkubationsmedium wurde der Krebs-Henseleit-Bikarbonatpuffer verwendet. Seine Elektrolytzusammensetzung kommt der des Säugetierserums sehr nahe. Die organischen Anionen des Serums sind durch eine etwas höhere Chloridkonzentration ersetzt. Durch Begasen mit einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxyd (Carbogen) stellt sich die Pufferlösung auf pH 7,4 ein.

Zur Herstellung der Lösung werden folgende Stammlösungen verwendet:

1. 0,9 % NaCl-Lösung
2. 1,15 % KCl-Lösung
3. 1,67 % $CaCl_2.2H_2O$-Lösung
4. 2,11 % KH_2PO_4-Lösung
5. 3,82 % $MgSO_4.7H_2O$-Lösung
6. 1,3 % $NaHCO_3$-Lösung (mit CO_2 durchgast)
7. Gasgemisch mit 5 Vol.-% CO_2 und 95 Vol.-% O_2

Aus den Stammlösungen stellt man für jeden Versuch die Mischung neu her (in Klammer die Endkonzentration in der Pufferlösung).

100 Teile Lösung 1	(118,4 mM NaCl)
4 Teile Lösung 2	(4,7 mM KCl)
3 Teile Lösung 3	(2,6 mM $CaCl_2$)
1 Teil Lösung 4	(1,2 mM KH_2PO_4)
1 Teil Lösung 5	(1,2 mM $MgSO_4$)
21 Teile Lösung 6	(25,0 mM $NaHCO_3$)

und begast die Mischung zehn Minuten mit dem Gasgemisch. Schließlich wird durch die Zugabe von wasserfreier Glukose in einem Teil der Pufferlösung eine Zuckerkonzentration von 7,2 mM (130 mg %) bzw. 13,9 mM (250 mg %) erreicht.

2. Herstellung der Erythrozytensuspension

Die roten Blutkörperchen wurden entweder aus heparinisiertem Frischblut oder aus Blutkonserven gewonnen. Zur Abtrennung des Plasmas wurde das heparinisierte Frischblut 30 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und das Plasma zusammen mit der auf den sedimentierten Erythrozyten schwimmenden Leuko- und Thrombozytenschicht abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in der glukosehaltigen Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen und nachfolgend bei 2500 x g 20 Minuten zentrifugiert.
Das sogewonnene Erythrozytenkonzentrat wurde mit dem zukkerhaltigen Puffer auf einen Hämatokrit von 50 % eingestellt.

3. Inkubation der Erythrozyten in der Arzneimittellösung

Zu 3 ml der in Punkt 2 beschriebenen Zellsuspension wurden 0,1 ml des in 0,9 % NaCl-Lösung gelösten Pharmakons gegeben, so daß die gewünschte Endkonzentration in der Erythrozytensuspension erreicht wurde. Zur Kontrollsuspension wurde die gleiche Menge isotoner Kochsalzlösung gegeben. Die daraus resultierende Hämatokritänderung von ca. 1 % war bei allen angesetzten Suspensionen gleich und konnte vernachlässigt werden. Die beiden Zellsuspensionen wurden 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und in weiteren 15 Minuten auf 2 ^{0} C abgekühlt. Dazwischen

wurde einige Male vorsichtig geschüttelt.
Die Morphologie der roten Blutkörperchen in der Arzneimittellösung und in der Kontrolle wurde mikroskopisch untersucht.

4. Das Auswaschmedium

Das Auswaschmedium ist das glukosefreie Suspensionsmittel, in das die mit Glukose beladenen Erythrozyten pipettiert werden. Es bestand aus Krebs-Henseleit-Bikarbonatpuffer, in dem keine Glukose gelöst war. Um bei Zugabe der mit Glukose (13,9 mM bzw 7,2 mM) beladenen Zellen den Wassereinstrom in die Zelle - entgegen dem Glukoseausstrom - zu vermindern, lösten wir im Auswaschmedium 6,9 mM bzw. 3,6 mM NaCl (Karlish, Lieb, Ram und Stein 1972).
Bei der Durchführung des Versuches wurde im Außenmedium die Konzentration des Pharmakons eingesetzt, mit der auch die Erythrozyten inkubiert waren. Bei der Kontrollreihe wurden gleiche Mengen physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

5. Versuchsablauf

Um den Glukoseaustritt aus den Erythrozyten zu verlangsamen und damit besser messen zu können, wurden die Experimente im Kühlraum bei 2 ^{o} C durchgeführt.

Vorbereitung:
12 Bechergläser a 30 ml wurden mit je 10,0 ml glukosefreiem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt. In die 6 Bechergläser der Kontrollreihe wurden zusätzlich 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung und in die 6 Bechergläser der

Testreihe 0,3 ml der Pharmakonlösung gegeben. Die Konzentration dieser Pharmakonlösung war so angesetzt, daß diese 0,3 ml im Becherglas die gewünschte Endkonzentration ergaben.
0,2 ml der vorbereiteten Erythrozytensuspension ohne Pharmakon wurden in jedes der sechs Bechergläser der Kontrollreihe pipettiert und auf dem Magnetrührer kräftig gemischt. In das erste Becherglas wurde vor Zugabe der Zellsuspension die Stopperlösung gegeben. In das zweite Glas erfolgte die Zugabe der Stopperlösung nach 10 Sekunden, in das dritte nach 30, in das vierte nach 60, in das fünfte nach 120 und in das sechste nach 180 Sekunden.
Die Erythrozytensuspension, die mit dem Pharmakon inkubiert war, wurde in die Bechergläser pipettiert, die das Auswaschmedium mit dem Pharmakon enthielten. Auch hier wurde nach den oben genannten Zeitabständen der Glukoseausstrom durch Zugabe der Stopperlösung gehemmt.
Diese Stopperlösung bestand in einer Anzahl von Versuchen aus 0,1 ml einer 0,11 M $HgCl_2$-Lösung (Endkonzentration 0,01 M), in den übrigen Versuchen aus 1 ml Glutardialdehyd-Lösung (Endkonzentration 2,5 %)+).
In Zentrifugengläser umgefüllt, wurden die Mischungen nun sofort bei 2000 x g 8 Minuten in der Kälte zentrifugiert. Bei Verwendung des $HgCl_2$ in der Stopperlösung mußte der Überstand vorsichtig abgesaugt werden, während bei der Glutardialdehyd-Lösung die Zellen nach dem Zentrifugieren so zusammengepackt am Boden des Zentrifugenglases klebten, daß der Überstand leicht dekantiert werden konnte.
Die Zellen wurden nun mit 1 ml 0,33 N Perchlorsäure zer-

+) Da die Glutardialdehyd-Lösung nicht aus einer einheitlichen Substanz besteht, kann die Konzentration nur in % angegeben werden.

stört und durch erneutes Zentrifugieren bei 2000 x g während 10 Minuten abgetrennt.
Bei der Glutardialdehyd-Methode wurde der Überstand sofort in den Ansatz der Glukosebestimmung eingesetzt. Das Hg^{++} wurde zunächst mit BAL (Sulfaktin^{R}) ausgefällt.

6. Glukosebestimmung

In Anlehnung an die Biochemica-Test-Combination für Glukose von Boehringer Mannheim GmbH wurde die Bestimmung der Zuckerkonzentrationen in den Überständen im Halbmikroansatz durchgeführt.
Folgende Reagentien wurden verwendet:

1	Triäthanolamin-Puffer	0,3 M pH 7,5
	$MgSO_4$	4 mM
	EDTA	0,4 mM
2	NADP	12 mM
3	ATP	12 mM
4	Hexokinase	140 U/ml
	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	140 U/ml

In eine Halbmikroküvette wurden pipettiert:

Lösung 1	1,25 ml
Lösung 2	0,05 ml
Lösung 3	0,05 ml
Probe	0,01 ml

Mit einem Plastikspatel wurde gemischt und die Extinktion E_1 bei 334 nm abgelesen. Nach Zugabe von

Lösung 4	0,01 ml

wurde nochmals gemischt und nach Stillstand der Reaktion nach ca. 15 Minuten E_2 abgelesen.
Berechnung der Glukosekonzentration c (mM):

$$c = (E_2 - E_1) \cdot 25{,}6 \text{ mM} \qquad (1)$$

In Vorversuchen wurde der Einfluß von Quecksilberchlorid und Glutardialdehyd, sowie aller verwendeter Pharmaka auf die enzymatische Glukosebestimmung untersucht.
Bei der Quecksilberchlorid-Lösung genügte ein Ausfällen des Hg^{++} mit BAL (Sulfaktin^R), um die hemmende Wirkung der Schwermetallionen auf die Enzyme zu beseitigen.
Bei 4-Dimethylaminophenol war ein sofortiges Ablesen der Extinktion E_1 nach Zugabe der Probe notwendig, um vor der nach 2 - 5 Minuten einsetzenden Farbstoffbildung die richtigen E_1-Werte abzulesen.

7. Bestimmung des intrazellulären Lösungsraumes für Glukose

Ein Teil der Erythrozytensuspension wurde zehn Minuten zentrifugiert. Im Überstand und in den gepackten Zellen wurde die Glukosekonzentration bestimmt. Das Verhältnis der Glukosekonzentration der Zellen zur Glukosekonzentration im Überstand x 100 ergab dann das für die Glukose verfügbare intrazelluläre Lösungsvolumen in % des Erythrozytengesamtvolumens. Der errechnete Wert betrug im Mittel 69 % $\pm$ 3,6 (n=9).

8. Pharmaka

In Tabelle 1 sind die getesteten Arzneimittel mit den verwendeten Konzentrationen zusammengefaßt. Die Konzen-

TABELLE 1

SUBSTANZ	MOLEKULARGEWICHT	KONZENTRATION
4-DIMETHYL-AMINO-PHENOL	173	11,6 mM
		5,8 mM
		2,9 mM
DESIPRAMIN-HCL	302	1,0 mM
		0,1 mM
FUROSEMID	331	0,06 mM
VINCAMIN-HCL	391	0,3 mM
		0,03 mM
		0,003 mM
		0,0003 mM
CYTOCHALASIN B	480	0,1 mM

Tabelle 1: Zusammenstellung der untersuchten Pharmaka

tration der Substanzen wurde so angesetzt, daß bei Zugabe von 0,1 ml dieses Ansatzes zu 3 ml der Erythrozytensuspension die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde. Cytochalasin B wurde in Dimethylsulfoxyd (DMSO), die übrigen Substanzen in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

9. Berechnung der Eliminationshalbwertszeit für Glukose

Da sich unsere experimentell ermittelte Beziehung zwi-

schen intrazellulären Glukosekonzentration und Zeit rechnerisch der Exponentialfunktion

$$c = c_o \cdot e^{-kt} \qquad (2)$$

mit einem Korrelationskoeffizienten $r > 0{,}89$ sehr genau anpassen ließ, konnten wir die Halbwertszeiten für jeden Versuch nach der Gleichung

$$\frac{t}{2} = \frac{\ln 2}{k} \qquad (3)$$

leicht berechnen. c bedeutet dabei die Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t, c_o die fiktive Anfangskonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$, e die Basis des natürlichen Logarithmus und k die Eliminationskonstante.

10. Berechnung der Transportkonstanten K_m und V_{max}

Yun und Suelter (1977) gaben ein Verfahren an, wie man aus einer einzelnen Enzymreaktionsverlaufkurve die Konstanten K_m und V_{max} berechnen kann. Wir benutzten dieses Verfahren, um für unsere Transportkinetiken diese Konstanten zu bestimmen.
Durch Auftragen der Glukosekonzentration gegen die Zeit in einem Diagramm erhalten wir eine Kurve, wie sie in Abbildung 1 zu sehen ist. Von dieser Kurve wurde analog dem Yun-Suelter-Verfahren zum Zeitpunkt t_i der Wert S_i und zum Zeitpunkt t_j der Wert S_j abgelesen.
Wir wählten t_i und t_j so, daß dt_{ij} immer 0,5 Minuten war. Dadurch war dS_{ij} / S_i immer kleiner als 0,3. Diese Maßnahme vereinfachte die Berechnung, da wir den Korrekturfaktor $1 + a_i$ nicht anwenden mußten.

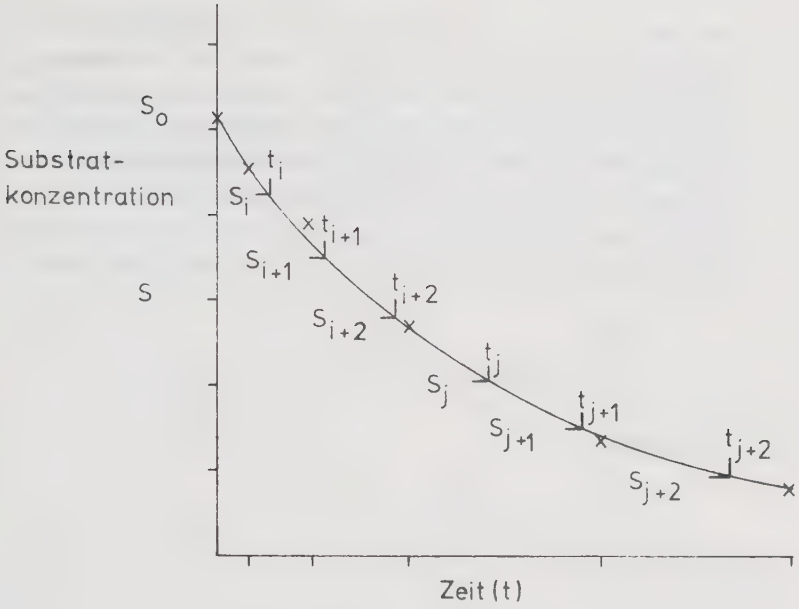

Abbildung 1: Bestimmung der Werte für S_i und S_j zum Zeitpunkt t_i bzw t_j

S_o bedeutet die Anfangskonzentration und S_i die Konzentration zum Zeitpunkt t_i,
$dt_{ij} = t_j - t_i$ und $dS_{ij} = S_i - S_j$.

Nachdem für jedes abgelesene Datenpaar S_i und S_j die Momentangeschwindigkeit $\bar{v} = dS_{ij} / dt_{ij}$ und die zu diesem Zeitpunkt gerade vorhandene Substratkonzentration $\bar{S} = (S_i + S_j) / 2$ leicht berechnet werden konnte, wurden die reziproken Werte $1 / \bar{v}$ und $1 / \bar{S}$ im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen (Abbildung 2).

Abbildung 2 zeigt ein Lineweaver-Burk-Diagramm, in das wir die Ergebnisse eines unserer Versuche eingetragen haben, die mit dem Verfahren nach Yun und Suelter berechnet wurden. Der Schnittpunkt der erhaltenen Gerade mit der Ordinate ergibt $1 / V_{max}$, der Schnittpunkt mit der Abszisse bestimmt $1 / K_m$. Aus den Verlaufskurven von acht Kontrollreihen berechneten wir dann die Mittelwerte für K_m und V_{max} und die dazugehörigen Standardabweichungen.

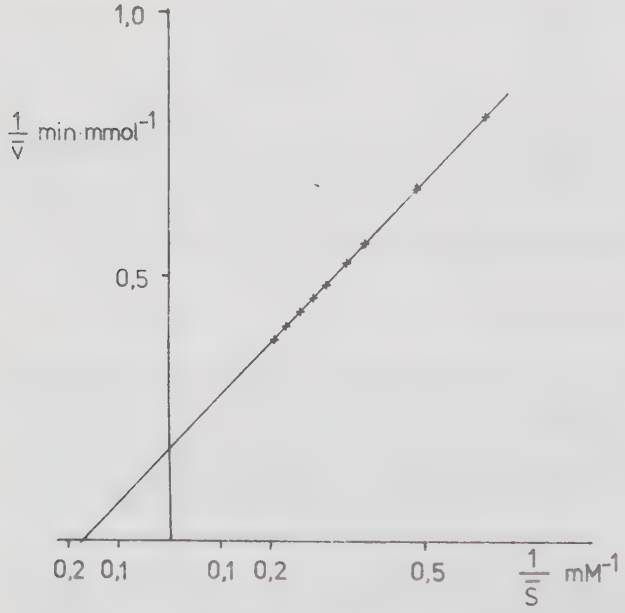

Abbildung 2: Lineweaver-Burk-Diagramm von $1 / \bar{v}$ und $1 / \bar{S}$ Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt $1 / V_{max}$, der mit der Abszisse ergibt $1 / K_m$.

III. ERGEBNISSE

In Abbildung 3 sind in Diagramm die Glukosekonzentrationen (mM), die sich zur Zeit t noch in den Zellen befanden, gegen die Zeit (sec) aufgetragen, um den exponenti-

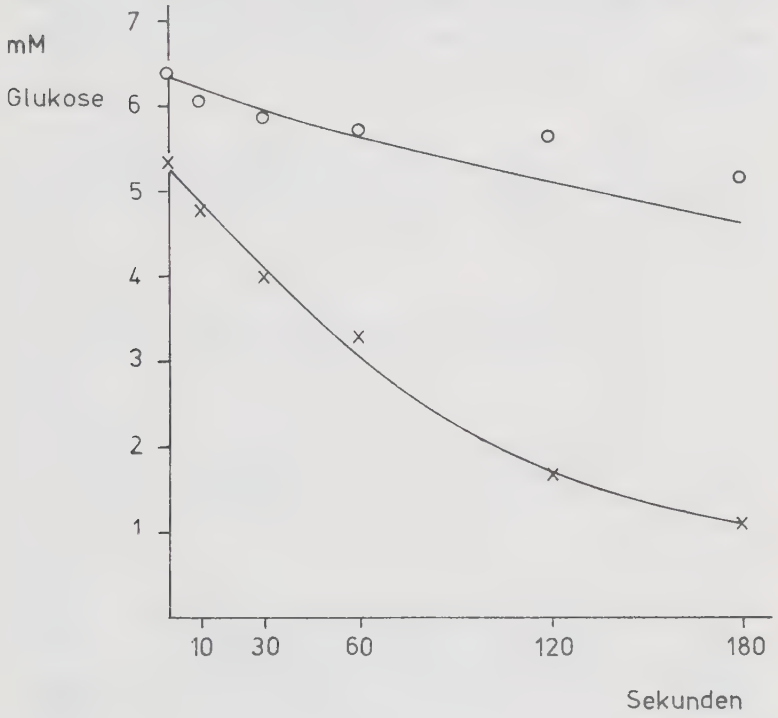

Abbildung 3: Abhängigkeit des Glukoseaustritts aus den Erythrozyten von der Zeit
o = Erythrozytensuspension mit 11,6 mM 4-Dimethylaminophenol inkubiert
x = Kontrollsuspension

ellen Charakter des Glukoseaustritts aus den Erythrozyten graphisch darzustellen.
Durch Auftragung im halblogarithmischen Raster kann die Eliminationshalbwertszeit auf der erhaltenen Geraden leicht abgegriffen werden (Abbildung 4). In beiden Abbildungen wurden die experimentell gefundenen Werte eingetragen und dazu die rechnerisch ermittelte Kurve eingezeichnet.

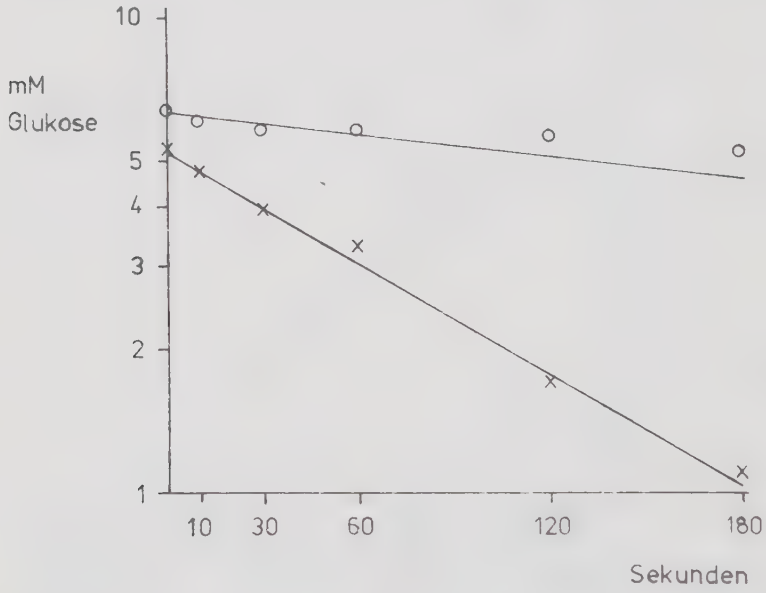

Abbildung 4: Die Steigung der Geraden ergibt die Eliminationshalbwertszeiten für den Glukoseaustritt
o = Erythrozytensuspension mit 11,6 mM 4-Dimethylaminophenol inkubiert
x = Kontrollsuspension

TABELLE 2

SUBSTANZ	KONZENTRATION	HALBWERTSZEIT (sec)		KORRELATIONSKOEFFIZIENT r	
		Kontrolle	Pharmakon	Kontrolle	Pharmakon
4-Dimethyl-	11,6 mM a)	78	654	0,99	0,92
aminophenol	11,6 mM a)	79	746	0,99	0,90
	11,6 mM a)c)	gegen 0	gegen 0	----	----
	5,8 mM a)	71	155	0,98	0,90
	5,8 mM a)	67	164	0,99	0,96
	5,8 mM a)	66	204	0,98	0,95
	2,9 mM a)	111	127	0,99	0,99
	2,9 mM a)	119	110	0,99	0,99
Desipramin-HCl	1,0 mM a)	76	79	0,98	0,98
	1,0 mM b)	102	112	0,98	0,98
	1,0 mM b)	89	105	0,99	0,99
	0,1 mM b)	86	92	0,99	0,95
Furosemid	0,06 mM a)	82	77	0,99	0,99
Vincamin-HCl	0,3 mM b)	101	115	0,92	0,92

TABELLE 2 (Fortsetzung)

Vincamin-HCl	0,3 mM [b]	120	111	0,98	0,98
	0,03 mM [b]	82	91	0,96	0,93
	0,03 mM [b]	78	73	0,99	0,95
	0,003 mM [b]	101	95	0,99	0,94
	0,003 mM [b]	93	84	0,97	0,94
	0,0003 mM [b]	95	72	0,97	0,99
	0,0003 mM [b]	115	86	0,89	0,95
Cytochalasin B	0,1 mM [a]	63	∞	0,92	----
	0,1 mM [a][c]	--	∞	----	----

Tabelle 2: Zusammenstellung der Werte für die Eliminationshalbwertszeiten und die verwendeten Konzentrationen der Pharmaka
Angegeben ist die Zeit (sec), in der die Hälfte der Ausgangskonzentration der Glukose im Erythrozyten erreicht wurde (ln 2/k), sowie der Korrelationskoeffizient r zur Exponentialfunktion $c = c_o \cdot e^{-kt}$

a) Beladung der Erythrozyten mit 13,9 mM Glukose
b) Beladung der Erythrozyten mit 7,2 mM Glukose
c) Bei 20° C durchgeführter Versuch

In Tabelle 2 (Spalte 3 und 4) sind die Eliminationshalbwertszeiten des Glukoseaustritts aus den Erythrozyten zusammengestellt.
Während Desipramin-HCl, Furosemid und Vincamin-HCl keine meßbare Änderung der Glukoseaustrittsgeschwindigkeit aus den roten Blutkörperchen bewirkten, konnte mit 4-Dimethylaminophenol eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zum Glukosetransport gefunden werden. Bei einer Konzentration von 2,9 mM 4-Dimethylaminophenol (DMAP) änderte sich die Eliminationshalbwertszeit für Glukose nicht meßbar, während mit der Konzentration von 5,8 mM DMAP eine etwa halbmaximale Hemmung des Zuckereffluxes erzielt werden konnte. Der Glukoseaustritt aus den Erythrozyten, die mit 11,6 mM DMAP inkubiert waren, war nahezu vollständig blockiert.

Eine Sonderstellung nahm Cytochalasin B in unseren Untersuchungen des Glukosetransports ein. Die von Bloch (1973) angegebene supramaximale Hemmkonzentration von 0,1 mM Cytochalasin B blockierte auch in unserer Versuchsanordnung den Glukoseaustritt aus den menschlichen Blutkörperchen völlig. Diese Substanz diente uns daher zur Prüfung der Methode; insbesondere konnten wir die Stopperqualität der von uns verwendeten Substanzen $HgCl_2$ und Glutardialdehyd messen.
Dazu wurde eine mit 13,6 mM Glukose beladene Erythrozytensuspension mit 0,1 mM Cytochalasin B, eine Zellsuspension mit 0,01 M $HgCl_2$-Lösung und eine Erythrozytensuspension mit 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung inkubiert. 0,2 ml jeder Suspension wurden analog des in Punkt II.5 beschriebenen Versuchsablaufes in ein Becherglas mit dem Auswaschmedium pipettiert. Nach gestoppten Zeitabständen wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und deren intrazelluläre Glukosekonzentration gemessen.

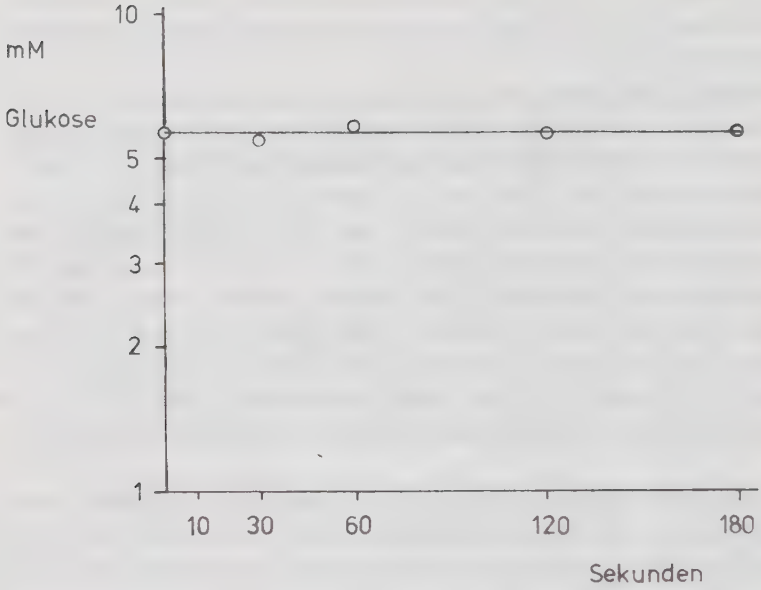

Abbildung 5: Hemmung des Glukoseefflux durch 0,1 mM Cytochalasin B bei 20° C

Sowohl mit 2,5 % Glutaridialdehyd-Lösung, als auch mit 0,01 M Quecksilberchlorid-Lösung gelang es, den Glukoseefflux bei 2° C zu hemmen. Versuche bei 20° C ergaben, daß mit den angegebenen Konzentrationen für Glutardialdehyd wie für Quecksilberchlorid keine vollständige Hemmung des Glukoseaustritts aus den Zellen möglich war.
Ebenso konnte mit der DMAP-Konzentration von 11,6 mM, die bei 2° C eine nahezu vollständige Blockierung des Glukoseeffluxes bewirkte, bei 20° C mit unserer Methode keine

Hemmwirkung gemessen werden.
Mit Cytochalasin B jedoch konnten wir auch mit unserem Verfahren bei 20° C den Glukoseaustritt aus den Zellen vollständig hemmen (Abbildung 5).

IV. DISKUSSION

Kritik der Methode

Der Vorteil von in vitro Untersuchungen des Einflusses von Pharmaka auf den Glukosetransport über die menschliche Erythrozytenmembran besteht in der Einfachheit und Überschaubarkeit des Versuchsmodells, in der Austauschbarkeit und der leichteren Manipulierbarkeit der verschiedenen Parameter. Dies ist jedoch auch gleichbedeutend mit einer Vereinfachung bzw. Verfälschung der tatsächlich in vivo ablaufenden Reaktionen, da die in vivo komplexen Einflüsse auf einen isoliert dargestellten biologischen Vorgang außer acht gelassen werden.

Daher stecken in diesem von uns abgewandelten Verfahren, das von Karlish, Lieb, Ram und Stein (1972) als zero-trans-Verfahren zur quantitativen Messung des unidirektionalen Glukosefluxes mittels Isotopenindikator benutzt wurde, Fehlermöglichkeiten, die zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen können:

1. Der Einfluß des mangelhaften Stoppeffektes von $HgCl_2$ und Glutardialdehyd auf die Messung der spezifischen Carrierfunktion

2. Veränderungen des Volumens der Erythrozyten durch kurzfristige Beladung mit hohen Glukosekonzentrationen

3. Störung der enzymatischen Glukosebestimmung durch Bildung eines Farbstoffes bei der Autoxidation von 4-Dimethylaminophenol

zu 1. Sowohl mit 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung, als auch mit 10^{-2} M Quecksilberchlorid-Lösung gelang es, bei 2° C den Glukoseefflux nahezu vollständig zu hemmen. Bei Beladung der Erythrozyten mit höheren Glukosekonzentrationen fanden wir - besonders zum Zeitpunkt Null unseres Versuchsablaufes - relativ weniger Glukose in den Erythrozyten. Dies würde somit eine Abnahme der hemmenden Wirkung von Glutardialdehyd und $HgCl_2$ auf den Glukoseaustritt bedeuten.
Versuche bei 20° C den Glukosetransport zu stoppen, scheiterten, auch wenn wir nur mit niederen Glukosekonzentrationen im Erythrozyten experimentierten.
Die in der Literatur (Britton 1964; Karlish et al. 1972) angegebenen großen Mengen an eiskalter Quecksilberchlorid-Lösung, deren $HgCl_2$-Konzentrationen bei 10^{-3} M bzw. 10^{-6} M liegen, bewirken demnach in erster Linie durch die rasche Temperatursenkung eine starke Verlangsamung des Glukoseeffluxes und erst in zweiter Linie sind die hemmende Wirkung der Stoppsubstanzen $HgCl_2$ und Glutardialdehyd von Bedeutung. Man mußte also vom Zeitpunkt der Zugabe der mit Glukose beladenen Erythrozytensuspension in das Auswaschmedium bis zum endgültigen Dekantieren des Überstandes exakt die gleiche Zeit einhalten, um die über die Versuchsdauer durch mangelndes Stoppvermögen verlorengehende Glukose konstant zu halten und um dadurch den Fehler zumindest bei niederen Glukosekonzentrationen und bei 2° C so gering wie möglich zu machen.
Im Vergleich dazu konnte Cytochalasin B bei 2° C und bei 20° C den Glukoseausstrom selbst bei höheren Glukosekonzentrationen in den roten Blutkörperchen vollständig hemmen.

Zwei Vorteile zeichneten Glutardialdehyd in unserem Ver-

suchsablauf gegenüber der Quecksilberchlorid-Lösung aus:

a) Da die Erythrozyten nach dem Abzentrifugieren zusammengeklebt am Boden des Zentrifugenglases festhafteten, konnte das Auswaschmedium zusammen mit dem ausgetretenen Glukoseanteil leicht abgeschüttet werden. Bei Verwendung der Quecksilberchlorid-Lösung mußte man den Überstand vorsichtig absaugen, was die Präzision sicher minderte.
b) Als weiterer Vorteil erwies sich die Tatsache, daß Glutardialdehyd die enzymatische Glukosebestimmung nicht verfälschte, während das Hg^{++} erst durch BAL (Sulfaktin^{R}) ausgefällt werden mußte.

zu 2. Bei der Berechnung der im Erythrozytenwasser gelösten Glukosemenge ist die Größe des intrazellulären Verteilungsraumes von großer Bedeutung. Die Angaben in der Literatur für den Wassergehalt der roten Blutkörperchen reichen von 62 % - 40 % (Hutchinson 1952; Schanker et al. 1961; Kübler und Männl 1970; Sgaragli und Zilletti 1970). Bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen betrug der von uns errechnete intrazelluläre Verteilungsraum für Glukose im Mittel 69 % $\pm$ 3,6 und liegt damit in der Grössenordnung des von Schanker angegebenen Wassergehalts des Erythrozyten.
Wurde nun ein Erythrozytenkonzentrat mit Krebs-Henseleit-Puffer, der 67 mM Glukose enthielt, zu Beginn auf einen Hämatokrit von 50 % eingestellt, so wurde den Erythrozyten durch diese hypertone Glukoselösung rasch Wasser entzogen. Die Zellen schrumpften und der Hämatokrit fiel auf 47 % ab und erreichte bei einer Raumtemperatur von 24° C erst nach 4 Stunden wieder seinen Ausgangswert. Noch stärker ausgeprägt fanden wir diese Schrumpfung der roten Blutkörperchen bei einer Konzentration von 161 mM Gluko-

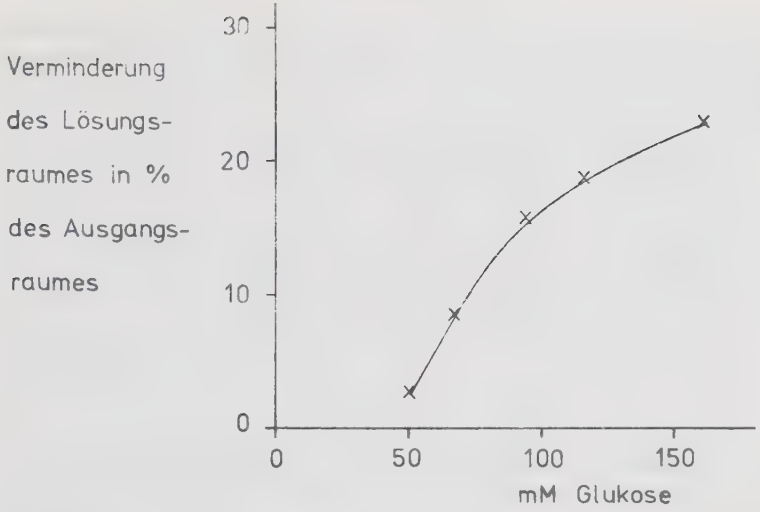

Abbildung 6: Verminderung des intrazellulären Lösungsraumes in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration in der Inkubationslösung

se. Hier sank der HK auf 42 % - dies entspricht einer Volumenabnahme des einzelnen Erythrozyten von 16 % - und erreichte erst nach 4 Stunden einen HK von 48,5 %. Berücksichtigt man nun, daß bei diesem Schrumpfungsvorgang nur das intrazelluläre Verteilungsvolumen abnimmt, so erhält man bei einem mittleren intrazellulären Verteilungsvolumen von 69 % der einzelnen Zelle ein um 23 % vermindertes intrazelluläres Lösungsvolumen.
In Abbildung 6 ist die Abnahme des intrazellulären Verteilungsraumes in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration der Inkubationslösung graphisch dargestellt.
In Abbildung 7 sehen wir, wie lange es dauert, bis der

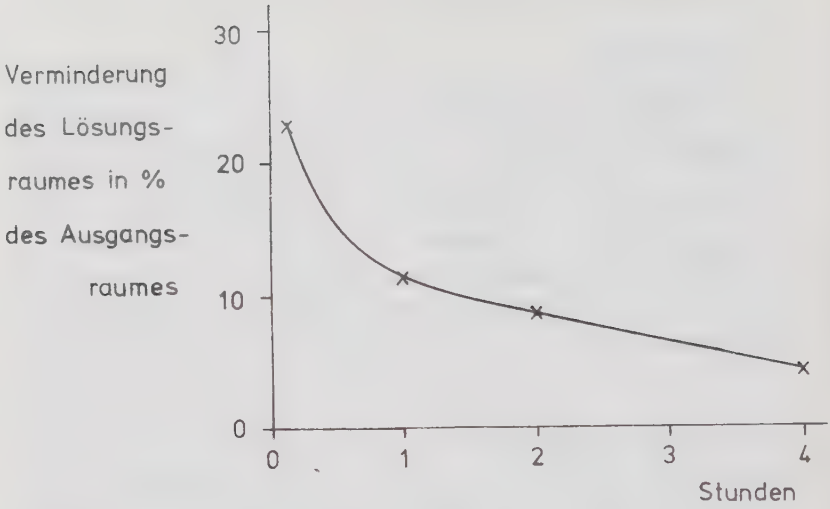

Abbildung 7: Abnahme der durch 161 mM Glukose bedingten Schrumpfung des Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit (Stunden)

Erythrozyt bei einer Konzentration von 161 mM Glukose wieder sein Ausgangsvolumen erreicht hat.
Wird dieser Schrumpfungsvorgang insbesondere beim infinite-cis-Verfahren nach Sen und Widdas (1962) nicht berücksichtigt, und die geschrumpften Erythrozyten - die zwar in ihrem verbliebenen Lösungsvolumen die gewünschte Konzentration an Glukose erhalten haben - in das Auswaschmedium gegeben, dann überschneiden sich hier der sicher viel raschere Wassereinstrom in die Zellen (zum Ausgleich des osmotischen Druckes und zur Erlangung der ursprünglichen Form der Zelle) und der gewünschte schnelle Glukoseausstrom aus der Zelle.

Das von einigen Autoren angewandte Verfahren, den Wassereinstrom durch eine der hohen Glukoseinnenkonzentration entsprechende Außenlösung mit höherer Osmolarität zu verhindern, kann diesen Fehler nicht ausgleichen. Diese Maßnahme sollte vielmehr einer Hämolyse der Erythrozyten vorbeugen (Britton 1964; Karlish et al. 1972). Da nach dem Stoppvorgang mit der Quecksilberchlorid-Lösung noch eine Vergrößerung der Zellen möglich ist, wird eine zu niedere intrazelluläre Glukosekonzentration errechnet, weil die bestimmte Glukosemenge auf ein größeres Erythrozytenvolumen bezogen wird.

zu 3. Während Pharmaka die quantitative Bestimmung markierter Glukose nicht verfälschen können, besteht bei unserer Änderung der Methode eine zusätzliche Fehlermöglichkeit.
Bei der enzymatischen Glukosebestimmung nach Bergmeyer (1970) wird die Meßstrahlung bei einer Wellenlänge von 334 nm abgelesen. Bei der Autoxidation von 4-Dimethylaminophenol in wässriger Phase entsteht bei ca. pH 7,5 (lösung 1 des Glukosebestimmungsansatzes) ein gelber Farbstoff, das 2-(N-Methyl-N-(p-hydroxyphenyl)-amino)-benzoquinonepoxid, das im UV-Spektrum ein Maximum bei 388 nm und bei 265 nm zeigt (Eyer et al. 1974). Dieses Reaktionsprodukt erhöht die Extinktion E_1 bei der von uns benutzten Wellenlänge von 334 nm. Nach Zugabe von Lösung 4 (Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) wird die Reaktion der enzymatischen Glukosebestimmung gestartet. Das dabei entstehende $NADP\text{-}H^+$ reduziert nun diesen Farbstoff, so daß der Farbstoff in der Küvette wieder verschwindet. In unseren Kontrollversuchen ergab sich eine Extinktion E_2, die dieselbe Größe wie bei der Glukosebestimmung ohne DMAP bei gleicher Glukosekonzentration

erreichte. Bei Nichtbeachtung dieser Tatsache würden somit falsch niedere Glukosewerte resultieren.
In Kontrollversuchen schüttelten wir das im Überstand bei ca. pH 1 (033 N Perchlorsäure) noch stabile 4-Dimethylaminophenol mit Äther aus und konnten somit genau die Glukosekonzentration bestimmen.
Um uns jedoch diesem zusätzlichen Arbeitsgang in unserer Methode zu ersparen, machten wir uns den Umstand zunutze, daß die Verfärbung erst mit einer Verzögerung von 2 - 5 Minuten beginnt (Eyer et al. 1974). Deshalb lasen wir sofort nach Zugabe der Probe (0,01 ml, pH 1) zum Ansatz (1,25 ml Pufferlösung, pH 7,5) den Leerwert ab und starteten anschließend sogleich die Reaktion durch Zugabe der Enzyme (Lösung 4). Dieses Vorgehen bei der Glukosebestimmung wurde in weiteren Kontrollreihen ohne DMAP bei gleichen Glukosekonzentrationen geprüft.

Besprechung der Ergebnisse

1. Glukosetransport über die menschliche Erythrozytenmembran

1.1. Kinetische Parameter des Glukosefluxes

Es wird allgemein angenommen, daß der Glukosetransport über die menschliche Erythrozytenmembran durch "katalysierte Permeation" erfolgt. Dies dürfte die sinnvollste Übersetzung des von Danielli (1954) geprägten Terminus "facilitated diffusion" sein (Sitte 1970), der bereits von LeFevre (1961) als ziemlich irreführend bezeichnet wurde. Nichtsdestoweniger entwickelte sich dieses Transportphänomen zu einem der am meisten erforschten Gebieten

der Membranphysiologie.

Beim Zuckertransport an der Membran der roten Blutkörperchen ließen experimentelle Fakten vermuten (Park et al. 1956; Rosenberg und Wilbrandt 1957; LeFevre und Mc Ginnis 1960), daß die reaktiven Bindungsstellen und die gebildeten Komplexe in der Membransubstanz frei beweglich sind, so daß die Teilchen, die diese reaktiven Stellen tragen, berechtigterweise "carrier" genannt wurden (LeFevre 1961).

Es wurden mehrere experimentelle Verfahren entwickelt, insbesondere die kinetischen Eigenschaften dieses Transportsystems zu erfassen (Widdas 1954; Rosenberg und Wilbrandt 1957; Sen und Widdas 1962; Levine et al. 1965; Mawe und Hempling 1965; Miller 1968; Lieb und Stein 1971). Da der katalysierte Transport mit der zu transportierenden Substanz gesättigt werden kann - wie ein Enzym mit seinem Substrat -, ging man davon aus, daß die Geschwindigkeit des Glukosetransports der Gleichung von Michaelis und Menten (1913) folgt:

$$J = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \qquad (4)$$

Dabei ist J der unidirektionale Flux, S die Konzentration des permeirenden Zuckers, V_{max} und K_m sind Konstanten.

1.2. Forschungsmethoden

Kinetische Forschungen der Carrier-Vermittlung erfordern genaue experimentelle Messungen des Fluxes über die Membran. Zwei größere technische Verfahren, die umfassend bei der Zuckerfluxmessung mit den Erythrozyten angewandt

wurden, sind Ørskovs Densitometrie (Ørskov 1935) und die in den letzten Jahren entwickelte Technik mit radioaktiven Isotopen. Die Densitometrie mißt den Flux indirekt, indem sie die Geschwindigkeit der Volumenänderung der Erythrozyten verfolgt, die durch die Geschwindigkeit des Lösungsumsatzes begrenzt ist (LeFevre 1954). Obgleich diese Methode einfach und schnell ist, mißt sie nur Nettofluxe und erfordert relativ hohe Zuckerkonzentrationen (Jung 1975). In diesem Zusammenhang erhalten unsere Ergebnisse über die Volumenänderung der Erythrozyten bei der Beladung mit hohen Glukosekonzentrationen eine grössere Bedeutung.

Die nach unseren Ergebnissen oft zu niedrig angesetzten Inkubationszeiten beim Beladen der Erythrozyten mit hohen Glukosekonzentrationen (z.B. bei Sen und Widdas 1962; bei Britton 1964; Bloch 1973; u. a.) haben zur Folge, daß, auf das augenblickliche Volumen bezogen, die Konzentration zwar die gewünschte Höhe hat, jedoch verursacht der rasche Wassereinstrom eine Anschwellung der Erythrozyten und dadurch eine Herabsetzung der Glukosekonzentration im intrazellulären Lösungsraum der roten Blutkörperchen. Da nun der Konzentrationsgradient die treibende Kraft für den Glukoseefflux darstellt, wird diese treibende Kraft durch die Verdünnung vermindert.

Möglicherweise ist dies einer der Gründe, warum der von Sen und Widdas (1962) errechnete Wert für K_m um eine Größenordnung unter dem von uns erhaltenen Wert liegt (siehe Tabelle 3). Einer Lösung der Frage, ob nun ein symmetrischer oder asymmetrischer Glukosecarrier vorliegt (Lieb und Stein 1972; Jung 1975), kommt diese Tatsache nur wenig näher, da diese Vorgänge bei der Beladung keine Änderung im Zehnerpotenzbereich bewirken.

Ähnliche Überlegungen jedoch werden auch von Wilbrandt

und Fuhrmann (1977) geäußert. Sie zeigten, daß eine Bedingung für die Berechnung der Michaeliskonstante einer Sättigungskinetik mit dem Lineweaver-Burk-Diagramm darin bestehen muß, daß "aktuelle Konzentrationen" eingesetzt werden und nicht Beträge einer permeirenden Substanz pro Zelle, wenn das Zellvolumen nicht konstant ist. Dies würde eine zu niedere Michaeliskonstante im Diagramm ergeben.

Yun und Suelter (1977) gaben eine einfache Methode an, wie man aus einer einzigen Enzymreaktionsverlaufskurve K_m und V_{max} berechnen kann, ohne dabei Anfangsgeschwindigkeiten für verschiedene Substratkonzentrationen für die Berechnung des Reaktionsverlaufes erreichen zu müssen. Wir bestimmten aus acht Verlaufskurven einen Mittelwert für K_m von $4,9 \pm 0,7$ mM bei 2° C. Dieser Wert liegt somit um eine Größenordnung über dem (extrapolierten) Wert, der

TABELLE 3

K_m (mM)	Temperatur	Experimentierverfahren
0,4 +)	2° C	infinite-cis (Sen und Widdas)
4,9	2° C	zero-trans (unsere Werte)
1,8	20° C	infinite-cis (Sen und Widdas)
25,4	20° C	zero-trans (Karlish et al.)

+) extrapolierter Wert (Abbildung 8)

Tabelle 3: Gegenüberstellung der K_m-Werte von Sen und Widdas; Karlish et al. und unserem Wert.

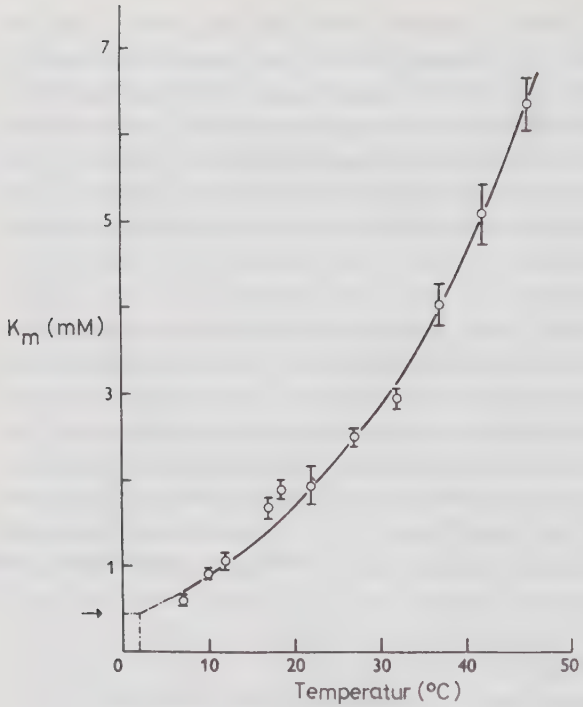

Abbildung 8: Der Einfluß der Temperatur auf K_m nach Sen und Widdas (1962).
Wir extrapolierten aus diesem Diagramm den Wert für K_m bei 2° C.

von Sen und Widdas (1962) angegeben wurde (Abbildung 8). Bei einer Temperatur von 20° C fanden Karlish et al. (1972) einen K_m-Wert, der ebenfalls eine Größenordnung über dem von Sen und Widdas ermittelten K_m-Wert bei 20° C liegt.

2. Der Einfluß von Pharmaka

2.1. Rückschlüsse aus der Wirkungsweise und der Konfiguration von Pharmaka auf den Carrier

Mit vielen unterschiedlichen Verfahren wurde versucht, die molekularen Mechanismen und die Struktur des Carriers zu ergründen (Jung et al. 1971; Taverna und Langdon 1973; Lieb und Stein 1976; Kasahara und Hinkle 1977; Jung und Rampal 1977). Die beiden bemerkenswertesten Eigenschaften der carrier-vermittelten Transportfunktion sind das stereospezifische Erkennungsvermögen der Substrate und die hohe Geschwindigkeit der eigentlichen Translokation der Zuckermoleküle über die Membran (Jung 1975).
Gerade das stereospezifische Erkennungsvermögen molekularer Strukturen war einer der Hauptangriffspunkte einer Reihe von Untersuchungen (LeFevre 1961; Stein 1967; Barnett et al. 1973), bei denen verschiedene Zucker um die offensichtlich identischen Carrierstellen konkurrieren und sich kompetitiv hemmen.
Eine andere Art der kompetitiven Hemmung wurde mit einer Klasse von Medikamenten gefunden, bei denen die Strukturanalogie zum Zucker nicht mehr so deutlich ist. Aus einer Reihe von biphenolischen Verbindungen hemmen besonders Phlorizin, Phloretin (LeFevre 1954) und Diethylstilbestrol (LeFevre 1961) kompetitiv den Glukosetransport, auch wenn diese den Zucker nur bedingt strukturähnlichen Pharmaka nicht direkt um die Carrierbindungsstellen konkurrieren (Rosenberg und Wilbrandt 1957 a).
Chlorpromazin beeinflußt nach seiner Metabolisierung in der Zelle den Glukosecarrier in einer komplexen unspezifischen Art (Baker und Rogers 1973). Desipramin wird in der Zelle nicht metabolisiert. Beide in ihrer chemischen und

physikochemischen Eigenschaften ähnlichen Pharmaka setzen jedoch bei einer Konzentration von 10^{-4} M die Membranstabilität und Viskosität der Erythrozyten herab (Remien, persönl. Mitteilungen). Mit unseren Untersuchungen konnten wir keine Funktionsstörung des Glukosecarriers durch Desipramin nachweisen.
Furosemid hemmt in einer nicht-kompetitiven Art den Anionentransport, insbesondere von Cl^-, in der Erythrozytenmembran (Brazy und Gunn 1975). Wir konnten jedoch mit dem zero-trans-Verfahren keine Hemmwirkung auf den Glukosetransport in der Erythrozytenmembran finden.
Bei Vincamin handelt es sich um eine Substanz, von der behauptet wird, daß sie die Leistungsfähigkeit des Zentralnervensystems verbessert. Unsere Modellvorstellung, daß diese Verbesserung über eine Änderung der katalysierten Permeation von Glukose über die Zellmembran bewirkt werden könnte, fand in unseren Ergebnissen keine Grundlage.
Auf einen nicht-kompetitiven, jedoch reversiblen Hemm-Mechanismus beruht die Wirkung von Cytochalasin B (Bloch 1973; Zigmund und Hirsch 1972; Mizel und Wilson 1972). Die halbmaximale Hemmung des Glukosefluxes liegt bei ca. 5×10^{-7} M Cytochalasin B. Wir benutzten diese Substanz in einer supramaximalen Hemmkonzentration von 10^{-4} M, um einerseits unsere Stopperlösungen auf ihre Wirksamkeit zu prüfen und um andererseits eine Kontrolle über unseren gesamten Versuchsablauf zu gewinnen (siehe S. 25). Wir fanden heraus, daß Cytochalasin B die einzige Substanz bei unseren Untersuchungen war (einschließlich unserer Stopperlösungen $HgCl_2$ und Glutardialdehyd), die auch bei 20° C den Glukoseefflux vollständig hemmen konnte.

2.2. Die Wirkung von 4-Dimethylaminophenol auf die Mem-

bran der Erythrozyten.

Während wir mit Desipramin-HCl, Furosemid und Vincamin-HCl keinen meßbaren Einfluß auf den Glukosetransport an der Erythrozytenmembran finden konnten, bewirkte 4-Dimethylaminophenol (DMAP) bei einer Konzentration von 11,6 mM eine nahezu vollständige Blockade des Glukoseeffluxes bei 2° C. Mehrere Arbeiten postulieren, daß der carriervermittelte Glukosetransport eine intakte Sulfhydryl-Gruppe (SH-Gruppe) an der Außenseite der Membran erfordert (LeFevre 1961; Dawson und Widdas 1963; Jung 1975). Da nach Batt et al. (1976) auch SH-Gruppen in der Membran oder an deren Innenseite erforderlich sind, war unsere Fragestellung, ob DMAP durch seine Giftung in der Zelle (Eyer et al. 1974) eine selektive SH-Gruppenblockierung bewirkt und somit den Glukosetransport aus der Zelle beeinflußt.
Morell et al. (1964) berechnete eine Konzentration von 2,45 mol titrierbarer Hämoglobin-SH-Gruppen im Erythrozyten und 0,45 mol Glutathion-SH-Gruppen pro mol Hämoglobin im Erythrozyten. Dies ergibt bei einer normalen Hämoglobinkonzentration von 5 mmol/l Erythrozyten eine Konzentration der SH-Gruppen von 14,5 mmol/l Erythrozyten. Da nach Eyer und Kiese (1976) drei mol Glutathion-SH-Gruppen ein mol DMAP binden können, ergibt sich eine zur vollständigen Absättigung der SH-Gruppen notwendige DMAP-Konzentration von 12,9 mmol/l Erythrozyten.
In unseren Versuchen bei 2° C betrug die DMAP-Konzentration im Ansatz 11,6 mmol/l bei maximaler Hemmung, d.h. es konnten maximal 23,2 mmol/l Erythrozyten gebunden werden. Befanden sich 5,8 mmol/l im Ansatz - dies entspricht der Konzentration bei etwa halbmaximaler Hemmung -, standen 11,6 mmol/l Erythrozyten zur Verfügung. Keine meßbare Be-

einflussung des Glukosetransports fanden wir bei einer DMAP-Konzentration von 5,8 mmol/l Erythrozyten.
Bei Fehlen von Sauerstoff ist 4-Dimethylaminophenol in Erythrozytensuspensionen und Hämoglobinsuspensionen stabil. Erst in Anwesenheit von Sauerstoff kann Hämoglobin durch DMAP schnell zu N, N-dimethyl-quinonimin oxidiert werden, das kovalent an reaktive SH-Gruppen gebunden wird (Eyer et al. 1974; Eyer und Kiese 1976).
Die Ergebnisse von Eyer et al. (1974) zeigen, daß die Reaktion zwischen 4-Dimethylaminophenol und Hämoglobin die Ausgangsreaktion darstellt, die erst die weiteren Reaktionen und Abbauschritte von DMAP ermöglicht. Dies bedeutet, daß DMAP erst durch die Membran in die Zelle eindringen muß, um hier nach seiner Oxidation durch Hämoglobin zu N, N-dimethyl-quinonimin an die SH-Gruppen des Hämoglobins, des Glutathions und der Membraninnenseite kovalent gebunden werden zu können.
Da jedoch der Glukosetransport erst bei DMAP-Konzentrationen sicher gehemmt wird, die höher sind, als für die komplette Absättigung aller SH-Gruppen in der Zelle notwendig sind (Hämoglobin-SH-, Glutathion-SH- und Membran-SH-Gruppen), kann man folgern, daß die von Batt et al. 1976) geforderten intakten SH-Gruppen an der Innenseite der Membran keine wesentliche Bedingung für den Glukosetransport aus der Zelle heraus (zero-trans-Verfahren) darstellen. Die bereits bei einer Konzentration von 11,6 mmol DMAP / l Erythrozyten zu beobachtende Hemmung des Glukoseaustritts aus der Zelle dürfte vielmehr durch die zusätzliche Bindung an Amino-Gruppen (NH_2-Gruppen) an der Innenseite der Membran verursacht werden.

Eine andere Wirkung von DMAP käme noch in Betracht, wenn man die Bildung von Formaldehyd als Nebenprodukt der Re-

aktion von DMAP mit dem Hämoglobin berücksichtigt (Eyer et al. 1974). Bei einer Bildung von 10 % Formaldehyd aus der gesamten DMAP-Menge entstehen bei 37° C etwa 2,3 mmol Formaldehyd pro Liter Erythrozyten aus 23,2 mmol DMAP pro Liter Erythrozyten. Dem widerspricht jedoch die langsame Bildung von Formaldehyd bei 2° C. Außerdem kam es zu keinem anderen Ergebnis, wenn wir die Erythrozytensuspension mit DMAP nicht bei 2° C, sondern auch bei 20° C eine halbe Stunde inkubierten.

Somit zeigen die Versuche, daß in Bezug auf die Hemmung des Glukoseausstroms aus den Erythrozyten sich Glutardialdehyd, $HgCl_2$ und 4-Dimethylaminophenol gleichartig verhalten. Da Glutardialdehyd vorwiegend mit den NH_2-Gruppen der Membranproteine reagiert (Peters und Richards 1977), und da unsere Versuche mit DMAP keinen Hinweis auf eine spezifische Wirkung an intrazellulären SH-Gruppen ergaben, liegt es auch nahe, die Hemmeffekte auf eine Interaktion mit NH_2-Gruppen zurückzuführen. Man kann ferner daraus folgern, daß die Hemmung des Glukoseeffluxes durch $HgCl_2$ nicht allein durch Reaktion mit SH-Gruppen, sondern auch durch Reaktion mit NH_2-Gruppen verursacht wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß von Pharmaka auf den Glukosetransport in der menschlichen Erythrozytenmembran wurde mit dem zero-trans-Verfahren nach Lieb und Stein untersucht, das in einigen Punkten abgeändert wurde. Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß die Beladung der Erythrozyten mit hohen Glukosekonzentrationen wesentliche Volumenänderungen bewirkte. Deshalb untersuchten wir die Glukosetransportfunktion im Bereich physiologischer Glukosekonzentrationen. Die Untersuchungen wurden im wesentlichen bei 2° C durchgeführt.

Die Berechnung der Transportkonstante K_m erfolgte nach dem Verfahren, das von Yun und Suelter für Enzymkinetiken angegeben wurde. Wir bestimmten bei einer Temperatur von 2° C eine Michaeliskonstante von 4,9 mM $\pm$ 0,7 (zero-trans-Verfahren), die um eine Größenordnung über dem K_m-Wert (0,4 mM; infinite-cis-Verfahren) von Sen und Widdas bei 2° C lag. Der K_m-Wert von Karlish et al. (zero-trans) bei 20° C lag ebenfalls eine Größenordnung über dem K_m-Wert von Sen und Widdas bei 20° C (infinite-cis).

Während wir bei unserer Versuchsanordnung mit $HgCl_2$, Glutardialdehyd und 4-Dimethylaminophenol eine vollständige Hemmung des Glukosetransports aus den Erythrozyten bei 2° C erreichten, konnten wir bei 20° C keine Hemmung beobachten. Die Temperaturabhängigkeit der Glukosetransportfunktion wird somit durch diese Pharmaka verändert. Unter Einfluß dieser Pharmaka ist die durch Senkung der Temparatur bedingte Abnahme des Auswärtstransports von Glukose verstärkt. Im Unterschied dazu ist Cytochalasin B bei einer supramaximalen Konzentration von 0,1 mM in der

Lage, sowohl bei 20° C als auch bei 2° C den Glukoseefflux vollständig zu hemmen.

Mit 4-Dimethylaminophenol wurde untersucht, ob die Blokkierung der SH-Gruppen an der Innenseite der Membran auf den Glukosetransport aus den Erythrozyten Einfluß nimmt, da 4-Dimethylaminophenol erst innerhalb der Zellen im Rahmen eines katalytischen Giftungsprozesses in der Lage ist, mit SH-Gruppen zu reagieren. Die Ergebnisse mit DMAP zeigten aber, daß der Glukoseausstrom erst in Konzentrationen gehemmt wurde, die höher waren, als für eine komplette Absättigung aller SH-Gruppen in den Erythrozyten notwendig waren.
Die Hemmung war analog zu $HgCl_2$ und Glutardialdehyd. Sie war nur bei 2° C und nicht bei 20° C mit unserer Methode meßbar.
Aus den Ergebnissen erscheint es nicht wahrscheinlich, daß den SH-Gruppen an der Innenseite der Plasmamembran für den Auswärtstransport von Glukose eine wesentliche Bedeutung zukommt. Es liegt vielmehr nahe, daß die Hemmeffekte bei $HgCl_2$, Glutardialdehyd und 4-Dimethylaminophenol im wesentlichen auf ein Interaktion mit NH_2-Gruppen zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu steht der spezifische nicht-kompetitive Hemmechanismus von Cytochalasin B.
Die membranwirksamen Pharmaka Vincamin, Desipramin und Furosemid beeinflußten bei unserem Versuchsablauf den Glukosetransport nicht meßbar.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

BAKER, G.F. and ROGERS, H.J. (1973)
Further effects of chlorpromazin on the hexose permeability of the human erythrocyte
J. Physiol. 232, 597-608

BARNETT, E.G., HOLMAN, G.D. and MUNDAY, K.A. (1973)
Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte
Biochem. J. 131, 211-221

BATT, E.R., ABBOTT, R.E. and SCHACHTER, D. (1976)
Impermeant maleimides
J. Biol. Chem. 251, 7184-7190

BERGMEYER, H.U. (1970)
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie 2. Auflage, 1163-1168

BLOCH, R. (1973)
Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B
Biochemistry Vol. 12, 23, 4799-4801

BOWYER, F. and WIDDAS, W.F. (1958)
The action of inhibitors on the facilitated hexose transfer system in erythrocytes
J. Physiol. 141, 219-232

BRAZY, P.C. and GUNN, R.B. (1975)
Furosemide inhibition of chloride transport in human red blood cells

Physiologist 18, 151

BRITTON, H.G. (1964)
Permeability of the human red cell to labelled glucose
J. Physiol. 170, 1-20

DANIELLI, J.F. (1954)
The present position in the field of facilitated diffusion and selective active transport
Proc. Symp. Colston Res. Soc. 7, 1-14

DANIELLI, J.F. and DAVSON, H. (1935)
A contribution to the theory of permeability of thin films
J. cell. comp. Physiol. 5, 495-508

DAWSON, A.C. and WIDDAS, W.F. (1963)
Inhibition of the glucose permeability of human erythrocytes by N-ethylmaleimide
J. Physiol. 168, 644-659

EYER, P., KIESE, M. (1976)
Biotransformation of 4-dimethylaminophenol: rection with glutathion, and some properties of the reaction products
Chem.-Biol. Interactions, 14, 165-178

EYER, P., KIESE, M., LIPOWSKY, G. and WEGER, N. (1974)
Reactions of 4-dimethylaminophenol with hemoglobin, and autoxidation of 4-dimethylaminophenol
Chem.-Biol. Interactions 8, 41-49

HUTCHINSON, E. (1952)
The behavior of human erythrocytes in aqueous alcohol solutions

Arch. Biochem. Biophys. 38, 35-41

JUNG, C.Y., CARLSON, L.M. and WHALEY, D.A. (1971)
Glucose transport carrier activities in extensively washed human red cell ghosts
Biochim. Biophys. Acta 241, 613-627

JUNG, C.Y. (1975)
Carrier-mediated glucose transport across human red cell membranes
in "The red blood cell" (Surgenor, D.M., ed)
Vol. 2, 705-751 Academic Press, New York

JUNG, C.Y. and RAMPAL, A.L. (1977)
Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts
J. Biol. Chem. 252, 5456-5463

KARLISH, S.H.D., LIEB, W.R., RAM, D. and STEIN, W.D. (1972)
Kinetic parameters of glucose efflux from human red blood cells under zero-trans conditions
Biochim. Biophys. Acta 255, 126-132

KASAHARA, M. and HINKLE, P.C. (1977)
Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes
J. Biol. Chem. 252, 7384-7390

KÜBLER, W. und MÄNNL, H.F.K. (1970)
Die Permeation von Isoproterenol durch die Erythrozytenmembran der Menschen
Klin. Wschr. 48, 944-946

LEFEVRE, P.G. (1954)
The evidence for active transport of monosacharides across the red cell membrane
Symp. Soc. exp. Biol. 8, 118-135

LEFEVRE, P.G. (1961)
Sugar transport in the red blood cell: structureactivity relationships in substrates and antagonists
Pharmacolog. Rev. 13, 39-70

LEFEVRE, P.G. and McGINNIS, G.E. (1960)
Tracer exchange vs. net uptake of glucose through human red cell surface: new evidence for carrier-mediated diffusion
J. gen. Physiol. 44, 87-103

LEVINE, M., OXEANDER, D.L. and STEIN, W.D. (1965)
The substrate-facilitated transport of the glucosecarrier across the human erythrocyte membran
Biochim. Biophys. Acta 109, 151-163

LIEB, W.R. and STEIN, W.D. (1971 a)
in "Current topics in membranes and transport"
(F.Bronner and A.Kleinzeller, eds.)
Vol. 2, 1 Academic Press, New York

LIEB, W.R. and STEIN, W.D. (1971 b)
New theory for glucose transport across membranes
Nature New Biol. 230, 108-109

LIEB, W.R. and STEIN, W.D. (1976)
Testing the simple carrier using irreversible inhibitors
Biochim. Biophys. Acta 455, 913-937

MAWE, R.C. and HEMPLING, H.G. (1965)
The exchange of C^{14}glucose across the membrane of the human erythrocyte
J. cell comp. Physiol. 66, 95-104

MICHAELIS, L. und MENTEN, M.L. (1913)
Die Kinetik der Invertinwirkung
Biochem. Z. 49, 333-369

MILLER, D.M. (1968)
The kinetics of selective biologiacal transport across membranes
Biophys. J. 8, 1329-1338

MIZEL, S. B. and WILSON, L. (1972)
Inhibition of the transport of several hexoses in mammilian cells by cytochalasin B
J. Biol. Chem. 247, 4102-4105

MORELL, S.A., AYERS, V.E., GREENWALT, T.J. and HOFFMAN P. (1964)
Thiols of the erythrocyte
J. Biol. Chem. 239, 2696-2705

ØRSKOV, S.L. (1935)
Eine Methode zur fortlaufenden photographischen Aufzeichnung von Volumenänderungen der roten Blutkörperchen
Biochem. Z. 279, 241-249

PARK, C.R., CROFFORD, C.B. and KONO, T. (1968)
Mediated (nonactive) transport of glucose in mammilian cells and its regulation
J. gen. Physiol. 52, 296 s - 313 s

PETERS, K. and RICHARDS, F.M. (1977)
Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure
Ann. Rev. Biochem. 46, 523-551

ROBERTSON, J.D. (1959)
The ultrasturcture of cell membranes and their derivates
Biochem. Soc. Symp. 16, 3-43

ROSENBERG, T. und WILBRANDT, W. (1957 a)
Strukturabhängigkeit der Hemmwirkung von Phlorizin und anderen Phloretinderivaten auf den Glukosetransport durch die Erythrozytenmembran
Helv. Phys. Acta 15, 168-176

ROSENBERG, T. and WILBRANDT, W. (1957 b)
Uphill transport induced by counterflow
J. gen. Physiol. 41, 289-296

SCHANKER, L.S., NAFPLIOTIS, P. A. and JOHNSON, J.M. (1961)
Passage of organic bases into human red cells
J. Pharmacol. 133, 325-331

SEN, A.K. and WIDDAS, W.F. (1962)
Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit
J. Physiol. 160, 392-403

SGARAGLI, G. and ZILLETTI, L. (1970)
Passage of 4-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone into human erythrocyte
Pharmacol. Res. Communications 2, 31-38

SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L. (1972)
The fluid mosaic model of the structure of all membranes
Science 175, 720-731

SITTE, P. (1969)
Biomembranen: Struktur und Funktion
Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 82, H. 5/6, 329-383

STEIN, W.D. (1967)
The movement of molecules across cell membranes
Academic Press, New York 126-308

TAVERNA, R.D. and LANGDON, R.G. (1973)
Reversible association of cytochalasin B with human erythrocyte membrane
Inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytochalasin binding
Biochim. Biophys. Acta 323, 207-219

WIDDAS, W.F. (1954)
Facilitated transfer of hexoses across the human erythrocyte membrane
J. Physiol. 125, 163-180

WILBRANDT, W. and FUHRMANN, G.F. (1977)
False interpretation of membrane transport date due to osmotic volume changes of cells
Experentia 33, 1472-1475

YUN, S.L. and SUELTER, C.H. (1977)
A simple methode for calculating K_m and V from a single enzyme reaction progress curve
Biochim. Biophys. Acta 480, 1-13

ZIGMUND, S.H. and HIRSCH, J.G. (1972)
Cytochalasin B: Inhibition of D-2-deoxyglucose
Science 176, 1432-1434

LEBENSLAUF

Am 7. Februar 1953 wurde ich, Maximilian Siegmund Franz Xaver Ohneis, als Sohn des Kaufmanns Siegmund Ohneis und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Artinger, in Mallersdorf geboren.

Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich von 1963 - 1966 das Humanistische Gymnasium der Benediktinerabtei Ettal, wechselte 1966 an das Anton-Bruckner-Gymnasium in Straubing und legte dort 1972 das Abitur ab.

Im November desselben Jahres begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und im Wintersemester 1973/74 zusätzlich mit dem Studium der Medizin. Nach bestandener Ärztlicher Vorprüfung (August 1974) schloß ich das Medizinstudium mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 26. Oktober 1978 ab.
Seit November 1978 studiere ich noch weiter Zahnmedizin an der Universität München.